

## 癌患者末梢単核球の Interleukin 2 産生能と非特異的 キラー活性に関する研究

笹 川 裕

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

### Studies on Interleukin 2 Production and Non-specific Killer Activity derived from Peripheral Blood Mononuclear Cells in Cancer Patients

Yutaka SASAGAWA

*Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. I. Urushizaki)*

Interleukin 2(IL2) production and the nonspecific killer activities of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from cancer patients were investigated.

IL2 activity of PHA stimulated lymphocytes derived from control subjects and patients with non-treated advanced carcinoma was  $524.1 \pm 250.4$  nano Jurkat Units (nJ. U.)/cell and  $139.3 \pm 85.4$  nJ. U./cell, respectively. The mean value of IL2 activity in cancer patients was significantly lower than that of normal subjects and this phenomenon was observed in all the cancer patients having different primary lesions. IL1 release from bacterial lipopolysaccharide-stimulated monocytes in patients with carcinoma was significantly higher than that of normal subjects, suggesting that IL1 release was not responsible for the decrease of IL2 production in cancer bearers. Moreover, monocyte depletion augmented the IL2 release by PBMC of cancer patients and the monocytes derived from cancer patients possessed a higher suppressive activity on IL2 production than those from normal subjects. These results suggest that the increase of suppressive monocytes is responsible for the impairment of IL2 production. However, this suppression mediated by monocytes from cancer patients was not restored by a treatment with indomethacin, an inhibitor for synthesis of prostaglandin, which is known to be responsible for the decrease of IL2 in normal subjects, but was recovered by a treatment with phorbol myristate acetate (PMA). By reconstitution of lymphocytes with PMA-treated monocytes, the inhibitory activity was diminished, confirming that PMA directly acted on the suppressive monocytes. Nonspecific killer activity of PBMC induced by PHA (PHA activated killer) revealed a significant decrease in cancer patients and a supplementation of recombinant IL2 (rIL2) restored its killing activity, suggesting that the relative decrease of endogenous IL2 is responsible for the impaired PHA activated killer induction. On the other hand, the killing activity of cancer PBMC induced by rIL2 (IL2 activated killer) was similar to that of normal subjects, indicating that the population of IL2 responding nonspecific killer cells in cancer patients is the same as that of normal subjects.

---

#### Abbreviations :

IL1, 2	: interleukin 1, 2	CTL	: cytotoxic T lymphocyte
FCS	: fetal calf serum	PAK	: PHA activated killer
PHA	: phytohemagglutinin	S.I.	: stimulation index
LPS	: lipopolysaccharide	PG	: prostaglandin
PMA	: phorbol myristate acetate	J.U.	: Jurkat Unit
NK	: natural killer	L.U.	: lytic unit

Therefore, the supplementation of exogenous rIL2 for cancer patients may be a useful manner to restore the immune response in tumor bearers.

(Received February 19, 1987 and accepted March 16, 1987)

**Key words:** Interleukin 2, Suppressive monocyte, Cancer bearer, IL2 activated killer cell, Phorbol myristate acetate

## 1 結 言

生体の免疫学的腫瘍細胞排除機構は主に癌特異抗原に感作された cytotoxic T lymphocyte (CTL) や、非特異的な natural killer (NK) 細胞に代表される各種エフェクター細胞から成りたっている。これら CTL, NK 細胞の活性化及び増殖には T リンパ球より産生される interleukin 2 (以下 IL2) の存在が不可欠である (Lafferty *et al.*<sup>1)</sup>, Kuribayashi *et al.*<sup>2)</sup>).

一方、胃癌<sup>3-5)</sup>, 肺癌<sup>6,7)</sup>, 肝癌<sup>8)</sup>, 乳癌<sup>9)</sup> で報告がみられるように、進行した担癌生体においては概して細胞性免疫能が低下した状態にある。また、Takasugi *et al.*<sup>10)</sup> が、癌の進展に伴い NK 活性が低下すると報告したように、進行癌患者においては、腫瘍細胞排除機構が抑制された状態にあり、それが腫瘍細胞の増殖を容易にしているものと考えられる。この免疫能の低下を是正し、宿主の抗腫瘍作用を高めることを目的として、従来より細菌製剤、植物多糖体などの免疫賦活物質やインターフェロンなどの宿主由来サイトカインの臨床応用が試みられてきた。最近 Taniguchi *et al.*<sup>11)</sup> により、ヒト T 細胞性白血病細胞株から IL2cDNA が作製され、これを大腸菌に組み込み、産生された recombinant IL2 (r IL2) が入手可能となったことからヒトでの臨床試験がおこなわれるようになってきた。担癌生体への IL2 投与は IL2 を介した抗腫瘍エフェクター細胞の活性化、増殖を意図したものであるが、担癌宿主リンパ球の IL2 産生能に関する報告はなく、SLE<sup>12,13)</sup>, Sjögren 症候群<sup>14)</sup> などの自己免疫疾患、免疫不全患者<sup>15,16)</sup> で IL2 産生に関する報告が散見されるのみである。今回、著者は主に消化器癌患者を対象として、患者末梢リンパ球をレクチン刺激後、培養上清中に遊離される IL2 活性を測定し、進行癌患者において IL2 産生能の著しい低下を認めたので、その抑制機序につき解析を加えた。さらに IL2 により誘導される非特異的キラー細胞の細胞障害活性についても *in vitro* で検討を加えたので報告する。

## 2 対象及び方法

### 2.1 対 象

札幌医科大学第四内科、札幌国立病院内科、道立札幌北野病院入院中の stage III, IV の未治療進行癌患者 35 名と早期胃癌患者 10 名の計 45 名を対象とした。進行癌患者の内訳は胃癌 12 名、食道癌 4 名、膵臓癌 5 名、結腸癌 5 名、肺癌 5 名、肝細胞癌 2 名、胆嚢癌 2 名であり、年齢構成は 28~74 歳、平均 52.06 歳であった。対照として年齢 30~65 歳、平均 36.59 歳で、男 19 名、女 4 名、計 23 名の健常者を用いた。

### 2.2 ヒト末梢単核球及び単球の分離

#### 2.2.1 ヒト末梢単核球の分離

末梢血 10 ml をヘパリン加採血し、滅菌生理食塩水で 2 倍希釈した後、Ficoll-Isopaque 液 (Ficoll 56.74 g/l Pharmacia, Sweden; Isopaque 108.69 ml/l 鳥居薬品) の上に静かに重層し、400×g, 30 分間比重遠心した。

遠心後、浮遊した単核球層を採取し、ampicillin 60 µg/ml, kanamycin 60 µg/ml を加えた RPMI1640 (GIBCO, USA.) 培養液で 3 回洗滌した後、10% fetal calf serum (FCS, FLOW) 加 RPMI1640 培養液で  $1 \times 10^6$  個/ml の濃度に調整し、末分画末梢単核球 (peripheral blood mononuclear cell, 以下 PBMC) 浮遊液とした。

#### 2.2.2 ヒトリンパ球、単球の分離

PBMC から付着細胞を除去、回収するために FCS 固相化プレート (マクロファージ純粋分離用特殊コーティングプレート, Japan Immunoresearch Labo.) を使用した。PBMC 浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個/ml) 3 ml をプレート (径 60 mm, 深 15 mm) に浮遊させ、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 60 分間培養した。上清を 5 ml の駒込ビペットで回収した後、RPMI1640 液 3 ml で 3 回プレートの洗滌を繰り返し、浮遊細胞を除去、回収した。この操作によるマクロファージ除去率は  $\alpha$  naphtyl acetate を基質としたエステラーゼ染色法によると  $80.3 \pm 10.2\%$  であった。プレートに付着したマクロファージの回収には氷冷 ethylenediamine tetraacetic acid 液

(EDTA 0.2 g/ml, 5%FCS 含有  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  不含 PBS, PH 7.0) 4 ml をプレートに添加した後, 4°C で 30 分間振盪し, 附着細胞を浮遊せしめて回収, RPMI1640 液で 3 回, 400×g, 10 分間遠心洗滌後, 単球浮遊液として実験に用いた。

### 2.3 PHA 刺激 PBMC 培養上清の作製と IL2 活性測定法

#### 2.3.1 PHA 刺激 PBMC 培養上清の作製

健康人または癌患者末梢血より採取した PBMC を培養液で  $1 \times 10^6$  個/ml に調整後, phytohemagglutinin (PHA-P, DIFCO) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加し, 5% $\text{CO}_2$ , 37°C で 72 時間培養した。この培養上清を -20°C に凍結保存後 7 日間以内に上清中の IL2 活性を測定した。対照検体として, 培養に PHA-P を同濃度添加し, 以後同様の操作を加えたものを用いた。

#### 2.3.2 IL2 活性測定法

IL2 活性は IL2 依存性のクローン化したマウスキラー T 培養細胞株 (Cytotoxic T cell line; CTLL-2) の IL2 依存性細胞増殖を指標として測定した<sup>18)</sup>。CTLL-2 細胞はマサチューセッツ工科大学癌研究所 H. Eisen 教授より供与を受けた。CTLL-2 細胞は 10%FCS 加 RPMI1640 培養液で  $4 \times 10^4$  個/ml の濃度に調整し, 96 穴平底マイクロタイタープレート (Costar, #3799) に 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注した後, PBMC 培養上清を 10  $\mu\text{l}$  ずつ添加した。24 時間培養後,  $^3\text{H}$ -thymidine (Specific activity 21 Curies/mM, New England Nuclear 社) を 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  加え 4 時間パルスラベルした後, セルハーベスター (LABO MASH, ラボサイエンス) を用い細胞をフィルター (LM101-10, ラボサイエンス) 上に回収した。フィルターを充分乾燥させた後, toluene 66.7%, 2-5-diphenyloxazol 4g/l, 1-4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzene 0.1 g/l, Triton X-100 33.3% のシンチレーションカクテル中に溶解させ, 液体シンチレーションカウンター (Beckman, LS 250) で放射能量を測定した。IL2 活性は同時にヒト遺伝子組み換え型 IL2 (TGP-3, 比活性  $52.45 \times 10^6$  Jurkat Units (J. U.)/mg protein) を標準品とし, 0 mJ. U./ml, 250 mJ. U./ml, 500 mJ. U./ml, 750 mJ. U./ml, 1000 mJ. U./ml の濃度で加えて得られた  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みから検量曲線を算出し, 培養上清中に遊離された IL2 を nJ. U./cell であらわした。

### 2.4 LPS 刺激ヒト単球培養上清の作製と IL1 活性測定法

#### 2.4.1 LPS 刺激ヒト単球培養上清の作製

マクロファージ浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個/ml) に 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の lipopolysaccharide (LPS, Salmonella enteritidis, SIGMA) を添加し, 5% $\text{CO}_2$ , 37°C で 24 時間培養した。培養上清を -20°C で保存し, IL1 活性測定に供した。対照検体として, 細胞を加えず培養液に LPS を等濃度添加し, 以後同様の操作を加えたものを用いた。

#### 2.4.2 IL1 活性測定法

IL1 活性は Gery *et al.*<sup>19)</sup> の方法に準じ, マウス胸腺細胞の分裂促進効果でみた。すなわち 4~6 週齢の雄性 C3H/He マウス (日本チャールズリバー) の胸腺を摘出し, ステンレスメッシュを通して胸腺細胞の浮遊液を得, 2 回洗滌後, 10%FCS 加 RPMI1640 培養液で  $5 \times 10^6$  個/ml に調整, 96 穴平底マイクロタイタープレートに 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。各 well に LPS 刺激マクロファージ培養上清, もしくは対照検体を 10  $\mu\text{l}$  加え, 5% $\text{CO}_2$ , 37°C で 48 時間培養後,  $^3\text{H}$ -thymidine 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  を加え, さらに 24 時間培養後セルハーベスターを用いて細胞を回収した。回収した細胞の放射能量は液体シンチレーションカウンターで測定し, IL1 活性は次式に示す stimulation index (S.I.) で算出した。

$$\text{S.I.} = \frac{\text{cpm (thymocyte + LPS 刺激単球培養上清)}}{\text{cpm (thymocyte + 対照検体)}}$$

### 2.5 PBMC からの単球の除去と再構成

#### 2.5.1 PBMC からの単球の除去

健康者 23 名, 癌患者 27 名, 計 50 名の PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) から, FCS 固相化プレートを用いた 2.2.2 の方法に従って単球を除去し, 単球除去リンパ球浮遊液を作製した。各々 50 名の PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) と単球除去リンパ球浮遊液の PHA 刺激培養上清を作製し, 各上清中の IL2 活性を測定した。

#### 2.5.2 末梢リンパ球, 単球の再構成

単球を除去した癌患者リンパ球  $0.95 \times 10^6$  個に, 健康者単球を各々  $1.25 \times 10^4$  個,  $2.5 \times 10^4$  個,  $5 \times 10^4$  個加えた 1 ml の PBMC を再構成し, 各 PBMC の PHA 刺激培養上清を作製した。又, 単球を除去した健康者リンパ球  $0.95 \times 10^6$  個に癌患者単球を  $1.25 \times 10^4$  個,  $2.5 \times 10^4$  個,  $5 \times 10^4$  個加えて, 同様に 1 ml の PBMC を再構成し, 各 PBMC の PHA 刺激培養上清を作製し, 各培養上清中の IL2 活性を測定した。

## 2-6 Indomethacin, PMA, 粗 IL1 分画 による PBMC または単球処理法

### 2-6-1 Indomethacin による PBMC 処理

IL2 産生能が 273.5 nano Jurkat Units/cell 以下の IL2 低産生者である健常者 4 名, 癌患者 21 名の計 25 名を対象として, 各 PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) の PHA 刺激培養上清作製過程に RPMI1640 培養液で希釈した Indomethacin (SIGMA) を最終作用濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  となるように添加し, 培養上清を採取し上清中の IL2 活性を測定した。

### 2-6-2 PMA による PBMC 及び単球処理

健常人 4 名, 癌患者 15 名の IL2 低産生者 PBMC を用いて,  $4 \beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, SIGMA)  $1 \mu\text{g/ml}$  存在下で, 同様に PHA 刺激培養上清を作製し, 上清中の IL2 活性を測定した。さらに癌患者 PBMC から単球浮遊液 ( $5 \times 10^5$  個/ml) を分画し, PMA  $1 \mu\text{g/ml}$  存在下で 180 分間培養し, 3 回遠心洗滌を繰り返した後, 元の単球除去リンパ球浮遊液に加え再構成した。再構成された PBMC の PHA 刺激培養上清を採取し, 上清中の IL2 活性を測定し, PMA 非処理 PBMC の対照検体中の IL2 活性と比較検討した。

### 2-6-3 粗 IL1 分画の作製と PBMC 処理

IL1 は自治医大, 斎藤政樹教授から供与されたヒマクロファージ系培養細胞 U937 を PMA  $1 \mu\text{g/ml}$  で刺激して得た 72 時間後の培養上清を Sephadex-G75 カラムで分画し, 分子量約 15,000 の胸腺細胞刺激増殖活性の高い分画を粗 IL1 として用いた<sup>20)</sup>。IL2 低産生癌患者 6 名の PBMC を用い, IL2 刺激培養上清作製過程に 10% V/V の粗 IL1 液を添加し, 72 時間培養後の上清中 IL2 活性を測定, IL1 非投与の対照検体と比較した。

## 2-7 非特異的キラー細胞活性

### 2-7-1 $^{51}\text{Cr}$ -標識標的細胞の作製

ヒト白血病由来細胞株 K562 及びパーキットリンパ腫由来細胞株 Daudi を標的細胞として用いた。細胞を  $1 \times 10^6$  個/0.2 ml に調整し,  $100 \mu\text{Ci}$  の  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を添加,  $37^\circ\text{C}$  2 時間 incubate し,  $^{51}\text{Cr}$  標識を行い, 4 回洗滌後, 実験に用いた。

### 2-7-2 Natural killer 活性

健常者, 癌患者から PBMC を分離, エフェクター細胞とし, K562 及び Daudi の両細胞に対する細胞障害活性を E/T 比 10, 20, 40 とし,  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて測定した。

### 2-7-3 PHA activated killer (PAK) 活性

健常者, 癌患者 PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) を PHA-P  $10 \mu\text{g/ml}$  存在下で 72 時間刺激後の生細胞をエフェクターとし K562 細胞及び Daudi 細胞に対する細胞障害活性を E/T 比 10, 20, 40 とし  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて測定した。さらに IL2 活性低値を示した癌患者群を用いて, PAK 誘導過程に  $3.15 \times 10^3 \text{ J. U./ml}$  の human recombinant IL2 (TGP-3, TAKEDA) を添加培養し誘導された PAK のキラー活性を測定した。

### 2-7-4 IL2 activated killer 活性

健常者, 及び癌患者 PBMC を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整し, rIL2 を隔日添加 ( $3.15 \times 10^3 \text{ J. U./ml}$ ) し, 6 日間培養した。培養後の生細胞をエフェクターとし, K562 細胞, Daudi 細胞に対する細胞障害活性を E/T 比 10, 20, 40 とし,  $^{51}\text{Cr}$  release assay を用いて測定した。

### 2-7-5 細胞障害活性算出法

Kadish *et al.*<sup>21)</sup> の方法に準じ, E/T 比 10, 20, 40 の % cytotoxicity を求め cytotoxic curve を作製し,  $1 \times 10^4$  個の標的腫瘍細胞に対し 30% cytotoxicity を示すのに必要なエフェクター数を算出し, これを lytic unit とし  $10^7$  エフェクター細胞中に存在する lytic units を用いて細胞障害活性を比較した。% cytotoxicity は次式より求めた。

% cytotoxicity =

$$\frac{\text{test cpm minus spontaneous release cpm}}{\text{total cpm/2 minus spontaneous release cpm}} \times 100$$

## 2-8 統計学的検定

各群における平均値の差の検定には, Cochran-Cox 法を用い, 危険率 5% 以下を有意とした。

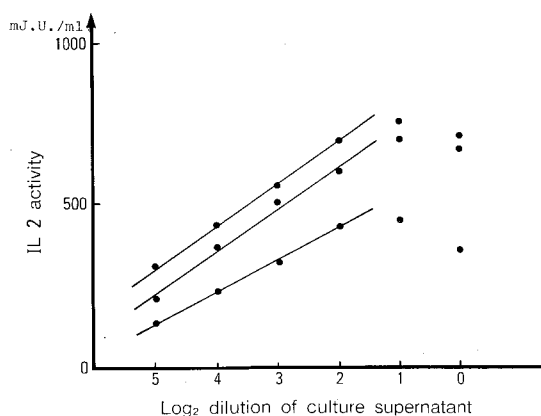
## 3 成 績

### 3-1 IL2 活性の microassay

PHA 刺激 PBMC 培養上清を,  $2^0$  倍から  $2^5$  倍まで希釈し, 各希釈上清中の IL2 活性を CTL 細胞の増殖促進効果を指標とした Jurkat unit で表した (Fig. 1)。培養上清の  $2^2 \sim 2^5$  倍希釈まで直線的な dose dependency をもって IL2 活性の増加を認めた。以下の PHA 刺激培養上清中の IL2 活性測定は最終 10 倍希釈で行った。

### 3-2 各種進行癌患者 PBMC の IL2 活性

健常人 23 名, 胃癌患者 12 名, 食道癌 4 名, 脾臓癌 5 名, 大腸癌 5 名, 肺癌 5 名, 肝細胞癌 2 名, 胆嚢癌 2 名, 計 58 名の末梢単核球の PHA 刺激 IL2 産生能を測定し, その結果を Fig. 2 に示した。癌患者はすべて stage III ~ IV の進行期癌で未治療患者を対象とした。IL2 産生能は健常人  $524.1 \pm 250.4 \text{ nJ. U./cell}$  に対し,

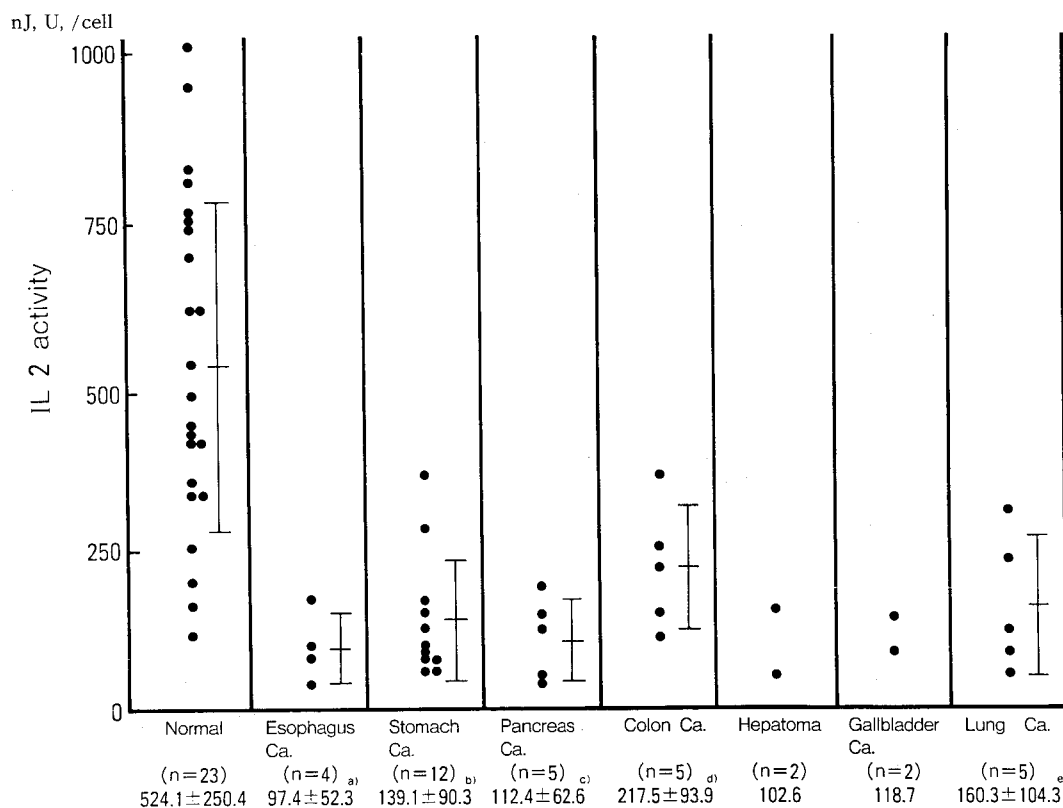


**Fig. 1** Effect of serial dilution of culture supernatant in IL2 microassay. IL2 activity was determined by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation of CTLL-2 cells induced by culture supernatant of PHA stimulated peripheral blood mononuclear cells. IL2 activity was expressed as milli Jurkat Units/ml of culture supernatant.

胃癌  $139.1 \pm 90.3$  nJ. U./cell, 食道癌  $97.4 \pm 52.3$  nJ. U./cell, 膵臓癌  $112.4 \pm 62.6$  nJ. U./cell, 大腸癌  $217.5 \pm 93.9$  nJ. U./cell, 肺癌  $160.3 \pm 104.3$  nJ. U./cell, 肝細胞癌  $102.6$  nJ. U./cell, 胆嚢癌  $118.7$  nJ. U./cell であった。進行癌患者では、原発巣に関係なく有意に IL2 産生能の低下を認めた。

### 3.3 早期及び進行胃癌患者別 PBMC の IL2 活性

胃癌患者を早期と進行期に大別して各々の IL2 活性を測定した結果を Table 1 に示した。健常人 23 名, 早期胃癌患者 10 名, 進行胃癌患者 12 名, 計 45 名の IL2 活性は, 健常人  $524.1 \pm 250.4$  nJ. U./cell に対し, 早期胃癌  $388.9 \pm 161.3$  nJ. U./cell, 進行胃癌  $139.1 \pm 90.3$  nJ. U./cell であった。健常群と進行胃癌群, 早期胃癌群と進行胃癌群の間には  $p < 0.01$  で, 進行胃癌群に有意な IL2 産生の低下を認めた。又, 健常群平均の 1 SD 以下の IL2 活性を有するものを IL2 低産生者とする, 健常群の 17.4%, 早期胃癌患者の 30.0%, 進行胃癌患者の 83.3% が IL2 低産生者であった。



**Fig. 2** PHA induced IL2 production from peripheral blood mononuclear cells of normal controls and patients with various malignancies. IL2 activity was expressed as mean nano Jurkat Units  $\pm$  SD/cell of culture supernatant. a), b), c), d), e) ... Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to normal subjects.

**Table 1** PHA induced IL2 production from peripheral blood mononuclear cells of normal subjects and patients with early or advanced gastric carcinoma.

PBMC	Number of cases	mean±SD	range	Distribution of IL2 production (percentage)		
				<273.5 <sup>a)</sup>	273.5-774.3	774.3<
control	23	524.1±250.4	115.4-1003.4	4/23 (17.4)	15/23 (65.2)	4/23 (17.4)
early cancer	10	388.9±161.3	186.5-666.0	3/10 (30.0)	7/10 (70.0)	0/10 (0.0)
advanced cancer	12	139.1±90.3 <sup>b,c)</sup>	62.2-355.2	10/12 (83.3)	2/12 (16.7)	0/12 (0.0)

IL2 activity was expressed as mean nano Jurkat units±SD/cell of culture supernatant. <sup>a)</sup> The population whose IL2 production was less than 1 SD of normal subjects (273.5 nano Jurkat Units/cell) was designated as a low producer. <sup>b)</sup> Significant difference ( $p<0.01$ ) with respect to all noncancer controls. <sup>c)</sup> Significant difference ( $p<0.01$ ) with respect to early cancer group.

### 3.4 CTLL-2細胞増殖に及ぼすPHA刺激癌患者PBMC培養上清の影響

PHA刺激癌患者PBMC培養上清中に、IL2活性測定に用いたCTLL-2細胞の増殖を直接抑制する因子が存在するかどうかを検討した。Table 2に示すように、健常者PBMCのPHA刺激培養上清A (control) 10  $\mu$ lに $2^0\sim 2^3$ 倍希釈した癌患者PBMCのPHA刺激培養上清B (cancer) 10  $\mu$ lを各々添加し、各混合培養上清のCTLL-2細胞増殖促進効果を $^3$ H-thymidineを用いた放射能で示した。その結果、上清B (cancer)の培養上清原液を10  $\mu$ l加えても $60802.5\pm 6345.6$  c.p.m.であり、対照の上清A (control) 10  $\mu$ lの値と有意差を認めなかったことから、癌患者PBMCのPHA刺激培養上清中にはCTLL-2細胞の増殖を直接抑制す

る因子は存在しないことが証明された。次に上清B (cancer) 10  $\mu$ lに $2^0\sim 2^3$ 倍希釈した上清A (control) 10  $\mu$ lを添加し、同様に各混合培養上清のCTLL-2細胞増殖効果を検討すると、上清A (control)の濃度依存性に放射能の増加を認めた。以上より、CTLL-2細胞を用いたassay系が、培養上清中のIL2活性を正確に反映することが証明された。

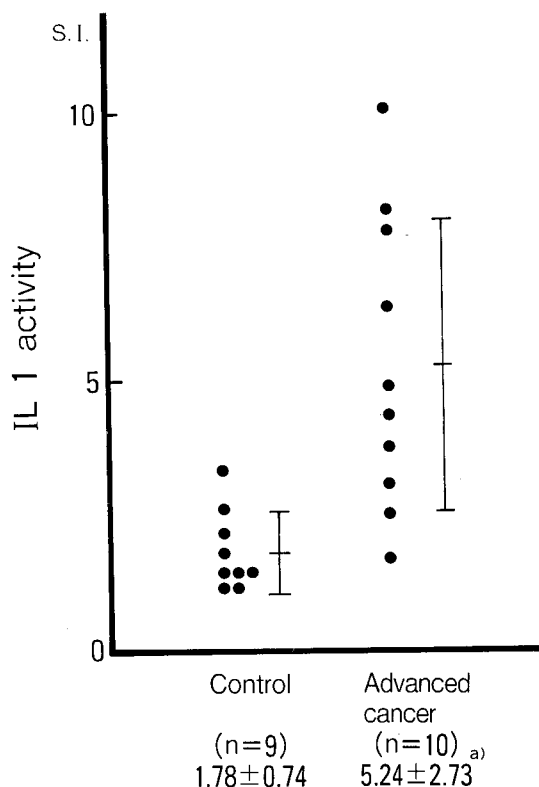
### 3.5 各種進行癌患者末梢単球のIL1活性

健常者9名、進行癌患者10名の末梢単球から産生されるIL1活性を測定した結果をFig. 3に示した。健常群 $1.78\pm 0.74$  (S.I.)に対し、癌患者 $5.24\pm 2.73$  (S.I.)であり、 $p<0.01$ で癌患者単球のIL1活性が高いことが示された。

**Table 2** Direct effect of a culture supernatant derived from normal or cancerous mononuclear cells on the response of CTLL-2 cell growth.

Culture supernatant	$^3$ H-Thymidine Incorporation (cpm±SD)
Control (A) 10 $\mu$ l	59125.0±5960.6
Control (A) 10 $\mu$ l + Cancer (B) 10 $\mu$ l ( $2^3\times$ dilution)	58451.3±4874.4
+ Cancer (B) 10 $\mu$ l ( $2^2\times$ dilution)	61902.5±2839.4
+ Cancer (B) 10 $\mu$ l ( $2^1\times$ dilution)	60857.5±4310.6
+ Cancer (B) 10 $\mu$ l ( $2^0\times$ dilution)	60802.5±6345.6
Cancer (B) 10 $\mu$ l	13832.5±2825.6
Cancer (B) 10 $\mu$ l + Control (A) 10 $\mu$ l ( $2^3\times$ dilution)	17448.8±6895.6
+ Control (A) 10 $\mu$ l ( $2^2\times$ dilution)	37303.8±3348.1
+ Control (A) 10 $\mu$ l ( $2^1\times$ dilution)	41415.0±7686.3
+ Control (A) 10 $\mu$ l ( $2^0\times$ dilution)	54181.9±5121.9

Ten microliter of supernatants derived from control subject (A) and cancer patient (B) were mixed with the same volume of an oppositely culture supernatant (A vs B, B vs A) with several dilutions ( $2^0$ ,  $2^1$ ,  $2^2$ ,  $2^3$ ), respectively. The CTLL-2 cell growth was expressed as  $^3$ H-thymidine incorporation (cpm±SD) of IL2 responsiveness.

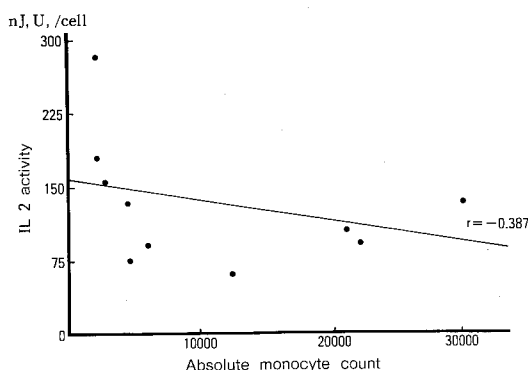


**Fig. 3** LPS induced IL1 production from peripheral blood monocytes of controls and patients with advanced carcinoma. a) Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to control. IL1 activity was expressed as mean stimulation index (S.I.)  $\pm$  SD.

### 3.6 癌患者単球の IL2 産生に及ぼす影響

#### 3.6.1 単球絶対数

癌患者 PBMC の PHA 刺激培養上清の IL2 活性に及ぼす, PBMC 中に含まれている単球数の影響につき検討し, その結果を Fig. 4 に示した. 横軸は PBMC  $1 \times 10^5$  個中に含まれる付着細胞の絶対数を示し, 縦軸



**Fig. 4** Correlation between IL2 activity and the absolute monocyte count. The absolute monocyte count indicated the number of adherent cells in  $1 \times 10^5$  peripheral mononuclear cells in  $100 \mu\text{l}$  of 96 well microtiter plates.

は  $1 \times 10^5$  個の PBMC を PHA 刺激し, 上清中に産生された IL2 活性を示す. PBMC  $1 \times 10^5$  個中に含まれる付着細胞の絶対数とリンパ球の IL2 活性の両者間において相関係数  $r = -0.387$  で相関を認めなかった.

#### 3.6.2 単球除去による効果

健常者 23 名, 癌患者 27 名の PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) と単球除去処理をおこなったリンパ球浮遊液の PHA 刺激培養上清中の IL2 活性を測定し, 結果を Table 3 に示した. 健常者では対照群  $524.1 \pm 250.4$  nJ.U./cell に対し, 単球除去群  $605.2 \pm 216.1$  nJ.U./cell であり, 両者間に有意差を認めなかったが, 癌患者では対照群  $145.0 \pm 93.6$  nJ.U./cell, 単球除去群  $239.5 \pm 148.4$  nJ.U./cell であり,  $p < 0.01$  で単球除去処理により IL2 活性の増強が認められた.

#### 3.6.3 末梢リンパ球, 単球の再構成

Table 4 に示したように癌患者 PBMC の IL2 活性は  $124.1$  nJ.U./cell であったが, 単球除去をした癌患者リンパ球  $95 \times 10^4$  個に, 健常者単球  $5 \times 10^4$  個を再構成し

**Table 3** Effect of monocyte depletion by FCS coated plastic plates on IL2 production of PBMC from control subjects and cancer patients.

PBMC	Number of cases	IL2 activity (nJ.U./cell)	
		mean $\pm$ SD	range
(1) Control	23	$524.1 \pm 250.4$	115.4–1003.4
monocyte depletion	23	$605.2 \pm 216.1^a)$	275.3–1110.0
(2) Cancer	27	$145.0 \pm 93.6$	44.4–356.4
monocyte depletion	27	$239.5 \pm 148.4^b)$	44.4–674.9

a) No significant difference with respect to control prior to monocyte depletion.

b) Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to cancer prior to monocyte depletion.

**Table 4** *Suppressive function of cancerous monocytes on IL2 producing cells by reconstitution of monocytes.*

Reconstituting cells	Number of Reconstituting cells ( $\times 10^4$ )	Number of normal monocytes ( $\times 10^4$ )	Number of cancer monocytes ( $\times 10^4$ )	IL2 activity (nJ. U./cell)
Cancer lymphocyte	95.0	0.0	5.0	124.1
	95.0	0.0	0.0	309.7
	95.0	1.25	0.0	354.3
	95.0	2.5	0.0	285.7
	95.0	5.0	0.0	350.9
	95.0	15.0	0.0	329.2
Normal lymphocyte	95.0	5.0	0.0	595.8
	95.0	0.0	0.0	648.5
	95.0	0.0	1.25	609.2
	95.0	0.0	2.5	428.0
	95.0	0.0	5.0	320.6

た PBMC  $1 \times 10^6$  個の IL2 活性は 350.9 nJ. U./cell であり、単球除去癌患者リンパ球の IL2 活性 309.7 nJ. U./cell に比べ有意差を示さなかった。一方、単球除去した健常者リンパ球に癌患者単球  $5 \times 10^4$  個を再構成した PBMC の IL2 活性は 320.6 nJ. U./cell であり、単球除去健常者リンパ球の IL2 活性 648.5 nJ. U./cell に比べ、活性の低下を示した。

### 3.7 IL2 低産生者の PBMC 及び単球に対する Indomethacin, PMA, 粗 IL1 分画の影響

IL2 産生能が 273.5 nJ. U./cell 以下の IL2 低産生者を対象とし、健常者 4 名、癌患者 24 名の PBMC から

単球を除去し、IL2 産生における単球の影響を検討した結果を Table 5 に示す。IL2 低産生者である健常者の IL2 産生能は  $179.8 \pm 56.3$  nJ. U./cell であったが、単球除去後には  $488.4 \pm 86.7$  nJ. U./cell と  $p < 0.01$  で有意な IL2 産生能の増加を示した。又、癌患者においても  $124.3 \pm 67.8$  nJ. U./cell から  $228.7 \pm 153.9$  nJ. U./cell と同じく、 $p < 0.01$  で有意な IL2 産生能増強効果が得られた。IL2 低産生である健常者 4 名、癌患者 21 名の PBMC ( $1 \times 10^6$  個/ml) に indomethacin  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加し作製した PHA 刺激培養上清では、健常者で indomethacin 非添加群  $179.8 \pm 56.3$  nJ. U./cell に

**Table 5** *Effect of monocyte depletion, treatment with indomethacin and PMA, as well as the addition of IL1 on IL2 production in low producer of normal subjects and cancer patients.*

Treatment	Number of cases	IL2 activity (nJ. U./cell)		Results of analysis treatment (+) vs (-)
		treatment (-)	treatment (+)	
Monocyte depletion	normal(4)	$179.8 \pm 56.3$	$488.4 \pm 86.7$	$p < 0.01$
	cancer(24)	$124.3 \pm 67.8$	$228.7 \pm 153.9$	$p < 0.01$
Indomethacin	normal(4)	$179.8 \pm 56.3$	$421.8 \pm 213.9$	$p < 0.01$
	cancer(21)	$116.7 \pm 71.2$	$160.3 \pm 135.4$	n. s.
PMA	normal(4)	$179.8 \pm 56.3$	$213.1 \pm 43.4$	n. s.
	cancer(15)	$124.6 \pm 58.6$	$235.6 \pm 174.4$	$p < 0.05$
IL1 addition	normal	N. D.	N. D.	
	cancer(6)	$142.8 \pm 41.3$	$142.8 \pm 40.0$	n. s.

Results were expressed as the mean nano Jurkat Units  $\pm$  SD/cell of examined cases.  
N. D.=not determined.



**Table 6** Effect of pretreatment of monocyte with PMA on IL2 release of reconstituted PBMC from cancer patients.

PBMC	Reconstituted monocyte <sup>a)</sup> preincubated with PMA	
	(-)	(+)
(1) Cancer (A)	186.3 nJ. U./cell <sup>b)</sup>	258.7 nJ. U./cell
(2) Cancer (B)	94.7 nJ. U./cell	397.3 nJ. U./cell

<sup>a)</sup> Monocytes were separated by FCS-coated plastic plates from PBMC of cancer patients. Monocytes were preincubated in the presence of PMA 1  $\mu$ g/ml for 180 minutes, washed three times, and reconstituted with non-adherent cells of the same patient.

<sup>b)</sup> Data represents the IL2 release of reconstituted mononuclear cells.

対し、添加群  $421.8 \pm 213.9$  nJ. U./cell であり、 $p < 0.01$  で有意な IL2 産生増強を認めた。癌患者では有意な増強を認めなかった。一方、IL2 低産生である健常者 4 名、癌患者 15 名の PBMC に、PMA 1  $\mu$ g/ml を添加培養すると、癌患者において、非添加群  $124.6 \pm 58.6$  nJ. U./cell に対し、添加群で  $235.6 \pm 174.4$  nJ. U./cell と、 $p < 0.05$  で有意な IL2 産生能の増強効果を認めた。健常者では PMA による IL2 産生の増強は認められな

かった。なお、実験に用いた indomethacin, PMA の濃度 1  $\mu$ g/ml では、共に CTLL-2 細胞増殖に対する直接作用を認めなかった。又、癌患者 6 名の PBMC に、粗 IL1 分画を添加して PHA 刺激培養上清中の IL2 活性を測定したが、有意な IL2 産生増加は得られなかった。次に、癌患者 PBMC の単球成分のみ PMA で前処理し、洗滌後再構成した PBMC の IL2 産生能を測定した結果を Table 6 に示した。Cancer (A) では 186.3 nJ. U./cell から 258.7 nJ. U./cell, Cancer (B) で 94.7 nJ. U./cell から 397.3 nJ. U./cell へと明らかな IL2 産生能の増強を認めた。

### 3.8 非特異的キラー細胞活性

健常者、癌患者末梢血より PBMC を分離し、NK 活性、PAK 活性、IL2 補充 PAK 活性、IL2 activated killer 活性を標的細胞 K 562 細胞及び Daudi 細胞を用いて測定した結果を Table 7 に示した。NK 活性は健常群  $380.4 \pm 140.2$  L. U. に対し、癌患者で  $99.5 \pm 52.7$  L. U. と  $p < 0.01$  で癌患者において有意な活性の低下を認めた。Daudi 細胞に対しては健常者、癌患者ともに 20 L. U. 以下で有意な細胞障害活性を認めなかった。PHA で誘導した PAK 活性は健常群において、K562 細胞に対し、 $264.8 \pm 204.3$  L. U., Daudi 細胞に

**Table 7** Cytotoxicity of non-specific killer cells induced from normal subjects and cancer patients in the presence of PHA and/or rIL2 against K 562 and Daudi cells.

Cultured condition	Normal PBMC		Cancer PBMC	
	K562	Daudi	K562	Daudi
None	$380.37 \pm 140.17$ (n=20)	$<20.0$ (n=6)	$99.49 \pm 52.66^a)$ (n=9)	$<20.0$ (n=9)
PHA (10 $\mu$ g/ml)	$264.79 \pm 204.25$ (n=14)	$290.18 \pm 244.38$ (n=7)	$115.14 \pm 99.74^b)$ (n=17)	$42.94 \pm 32.68^c)$ (n=12)
PHA+IL2 ( $3.15 \times 10^3$ J. U./ml)	N. D.	N. D.	N. D.	$493.82 \pm 335.41^d)$ (n=6)
IL2 ( $3.15 \times 10^3$ J. U./ml)	$738.25 \pm 271.73$ (n=12)	$579.36 \pm 230.71$ (n=11)	$628.74 \pm 291.81^e)$ (n=14)	$483.64 \pm 199.63^f)$ (n=12)

Cytotoxic activity was expressed as mean lytic units (L. U.)  $\pm$  SD/ $10^7$  PBMC. 1 L. U. was defined as the number of PBMC needed to effect 30% cytotoxicity of  $1 \times 10^4$  target cells.

<sup>a)</sup> Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to natural cytotoxicity from normal subjects against K562.

<sup>b)</sup> Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to PHA activated killer (PAK) from normal subjects against K562.

<sup>c)</sup> Significant difference ( $p < 0.05$ ) with respect to PAK activity from normal subjects against Daudi.

<sup>d)</sup> Significant difference ( $p < 0.01$ ) with respect to PAK activity from cancer patients against Daudi.

<sup>e)</sup> No significant difference with respect to IL2 activated killer activity from normal subjects against K562.

<sup>f)</sup> No significant difference with respect to IL2 activated killer activity from normal subjects against Daudi. N. D.=not determined.

対し  $290.2 \pm 244.4$  L. U. と両細胞に対し有意な障害活性を示し、癌患者においては、K562細胞に対し  $115.1 \pm 99.7$  L. U., Daudi細胞に対し、 $42.9 \pm 32.7$  L. U. と、健常群に比べ、各々  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  で有意な活性の低値を認めた. PAK誘導過程に rIL2 を  $3.15 \times 10^3$  J. U./ml の濃度で添加すると、Daudi細胞に対し  $493.8 \pm 335.4$  L. U. と  $p < 0.01$  で有意な細胞障害活性の増強を認めた. 又、rIL2 単独で誘導した IL2 activated killer 活性は、健常群において、K562細胞に対し  $738.3 \pm 271.7$  L. U., Daudi細胞に対し、 $579.4 \pm 230.7$  L. U. と強い障害活性を認め、また癌患者においても、K562細胞に対し  $628.7 \pm 291.8$  L. U., Daudi細胞に対し、 $483.6 \pm 199.6$  L. U. であり、健常者、癌患者ともに、両細胞に対する強い細胞障害活性を示した. 又、健常者、癌患者の間には活性の有意差を認めなかった.

#### 4 考 察

今回、著者は癌患者末梢単核球を用いて PHA 刺激培養上清中に遊離される interleukin 2 (IL2) 活性を測定した. その結果、進行癌患者では、原発巣と関係なく、健常群に比べ有意な IL2 産生能の低下を認めた. IL2 が、抗原、マイトーゲンに対する T リンパ球の反応性を高める作用を有していること<sup>22-29)</sup> から、癌患者での IL2 産生低下は、PHA などのレクチン刺激によるリンパ球芽球化反応を低下することにつながると考えられる. 実際、胃癌<sup>3-5)</sup>、肺癌<sup>6,7)</sup>、肝癌<sup>8)</sup> などの進行癌患者において、PHA によるリンパ球芽球化反応が有意に低下しているという報告が多い、IL2 産生低下の機序として、まず、癌患者単球から産生される IL1 活性が低下している可能性が考えられた. IL1 は IL2 産生 T 細胞が IL2 を産生するのに必須な物質であり<sup>30)</sup>、IL1 活性が不十分であれば、当然 IL2 産生が低下すると考えられた. そこで Gery *et al.*<sup>19)</sup> の方法に準じて、癌患者単球の IL1 活性を検討したところ Fig. 3 に示したように、健常者に比べ有意な活性の高値を示した. Pollack *et al.*<sup>31)</sup> も癌患者単球の IL1 活性を測定し、早期癌と全身に遠隔転移した末期癌においては IL1 活性の減少を認めたが、末期に到っていない進行癌では、逆に IL1 活性の高値を示すと報告している. 又、彼らが対象とした切除不能な進行癌、末期癌は全て chemotherapy あるいは radiation 等の前治療を受けていることから、未治療の進行癌を対象とした著者の成績と異なったものと思われる. さらに、IL2 低産生能を示した癌患者 6 名に対して、U937 細胞培養上清から分離した粗 IL1 分

画を補充添加しても、IL2 産生の増強を認めなかったこと、又、Table 3 に示すように、癌患者 PBMC から  $80.3 \pm 10.2\%$  の単球を除去すると、IL2 産生能が増強されたことより、癌患者単球からは IL2 産生を刺激するのに充分量の IL1 が産生されていて、癌患者では、むしろ抑制性単球が IL2 産生を調節しているものと考えられた. さらに、Table 4 に示したように、健常者 PBMC から単球を除去して得たリンパ球浮遊液に、癌患者単球を加え再構成すると、癌患者単球の明らかな IL2 産生能抑制効果が認められたことより、癌患者において、単球はいわば活性化された状態にあり、健常者単球に比べてより多くの IL1 を産生する一方、種々の suppressive monokine を産生し、この抑制機序が主に IL2 産生 T 細胞を調節している可能性が示唆された.

ところで、健常群において、IL2 産生能は  $115.4$  nJ. U./cell から  $1003.4$  nJ. U./cell まで幅広く分布することから、IL2 低産生者が健常者にも存在することが示された. Rey *et al.*<sup>32)</sup> も同じ結果を報告している. 1980 年、Bonnard *et al.*<sup>33)</sup> は、健常者には IL2 high producer と low producer が存在し、low producer においては adherent cell おそらく単球が抑制的に働いていると報告し、更に、健常人末梢単核球から Sephadex G 10 カラムを用いて adherent cell を除くと IL2 産生能が亢進すること、indomethacin で抑制が解除されることより、単球から産生される prostaglandin (PG) が IL2 産生を抑制していると報告した<sup>34)</sup>. Chouaib *et al.*<sup>35)</sup>、Walker *et al.*<sup>36)</sup> も健常者では PG が IL2 産生の regulatory molecule であり、PG により抑制性 T 細胞が誘導され、IL2 産生 T 細胞を抑制する機序の存在を示唆した. 本研究でも、健常低 IL2 産生者 4 名を対象として検討した結果、単球除去処理、indomethacin 添加により有意な IL2 産生の増強を認め、健常者においては、単球から産生される PG が主に IL2 産生を調節しているものと考えられた.

一方、癌患者における IL2 産生調節機構に関しては、これまで報告されていない. 著者は IL2 産生能  $273.5$  nJ. U./cell 以下である癌患者 PBMC を用いて、単球除去処理、indomethacin 添加による PG の影響、分化誘導物質である PMA<sup>17)</sup> の影響について検討した結果、単球除去処理、PMA 添加により、それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  の有意差をもって IL2 産生能の増強を認めた. 健常者群にみられた PG の影響が癌患者群では有意に認められなかったことから、癌患者における IL2 産生低下に PG の関与は少ないものと考えられる. 一方、PMA 添加により IL2 産生増強効果を認めたことから、PMA

が直接 T 細胞に作用し IL2 産生を高めた可能性と、単球に作用し, suppressive monokine の産生を抑制することにより IL2 産生を高めた可能性があげられる。事実, PMA は直接 IL2 産生 T 細胞に働き, IL2 産生を増強させる作用を有することがヒト T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat-FHCRC) で認められ<sup>18)</sup>, 島田らは T 細胞膜, 細胞質内に phorbol ester に対するレセプターが存在し, 結合することにより T 細胞内の IL2 mRNA が増加し IL2 産生が高まることを報告している<sup>37)</sup>。一方, Weinberg *et al.*<sup>38)</sup> は phorbol ester が receptor を介して腹腔マクロファージに作用し, hydroxyl radicals 産生に働くことを, 又 Gemsa *et al.*<sup>39)</sup> は 12-o-tetradecanoyl phorbol- $\beta$ -acetate (TPA) が腹腔マクロファージに作用し, hexose monophosphate shunt, RNA 合成, 蛋白合成, アラキドン酸代謝, pinocytosis など, 代謝及び機能面での亢進を促し, 活性化マクロファージを誘導することを報告している。PMA 添加により IL2 産生増強を認めた癌患者群は, 同じく単球除去処理で有意な IL2 産生増強を認めたことより, IL2 産生 T 細胞の機能は障害されておらず, むしろ PMA が単球に作用して IL2 産生 T 細胞を抑制している機構を解除した可能性が高い。そこで癌患者単球を直接 PMA で preincubate し, 充分洗滌した後, 再構成した PBMC の IL2 産生能を測定すると, Table 6 に示したように明らかな IL2 産生能の増強効果が認められ, PMA が直接, 癌患者単球に作用し IL2 産生を高めたと考えられた。すなわち, 癌患者においては, 単球由来の indomethacin 非感受性で且つ PMA 感受性の IL2 産生抑制機構が主体となって存在するものと言えよう。以上, 癌患者では IL2 産生能が低下した状態にあり, recombinant IL2 (rIL2) を補充することにより免疫能を賦活化させ得る可能性が明らかにされた。

そこで実際に IL2 が生体の腫瘍細胞排除に働く種々のキラー細胞の細胞障害活性を増強するかどうかの問題になる。1977 年, Gillis and Smith<sup>40)</sup> が IL2 投与により癌特異的な CTL の長期培養が可能であることを報告して以来, IL2 が *in vitro* 或いは *in vivo* でも CTL<sup>1,41,42)</sup>, NK<sup>43,44)</sup> の誘導, 増殖に不可欠であることが明らかにされてきた。更に Grimm *et al.*<sup>45)</sup> は IL2 により誘導される非特異的キラー T 細胞が担癌患者の抗腫瘍免疫監視機構として働く主要なエフェクターであると報告している。今回, 著者は癌患者における非特異的キラー, 即ち, natural killer (NK), PHA activated killer (PAK), IL2 activated killer の各細胞

障害活性を測定し, 進行癌患者での腫瘍細胞排除機構について検討した。NK 活性は Takasugi *et al.*<sup>10)</sup> が癌の進行に従って低下すると報告したように, 癌患者で有意な低下を認めた。PAK 活性においても同様に癌患者で有意な低下を認めた。Mazumder *et al.*<sup>46)</sup> は PAK 及び Alloantigen activated killer (AAK) 前駆細胞が effector へと分化する過程に, OKT 3 陽性細胞から産生される IL2 が必要であること, Vanky *et al.*<sup>47)</sup> は癌患者リンパ球を autologous tumor cell と混合培養した後, IL2 添加群と非添加群のキラー活性を比較したところ, IL2 添加群に高い活性を認めたと報告している。従って IL2 産生の低下している癌患者では, IL2 により誘導される種々の抗腫瘍キラー細胞活性が低下した状態にあることが予想される。実際, キラー活性低値であった癌患者 PBMC の PAK 誘導過程に rIL2 を補充することにより, Daudi 細胞に対する細胞障害活性は著明に増強された。さらに rIL2 を充分量添加し誘導された IL2 activated killer 活性は, K562 細胞, Daudi 細胞の両者に対し強い障害活性を有し, 健常群と癌患者群の間に差を認めなかった。このことは癌患者においても, 健常者と同等に非特異的キラー前駆細胞が存在する可能性を示唆するものである。以上, 非特異的キラー前駆細胞からキラー細胞への分化, 成熟する過程と, 成熟したキラー細胞がさらに活性増強, あるいは増殖する過程に必須な IL2 を癌患者に補充することは, 免疫能の是正, 腫瘍細胞排除機構の活性化の面で, 合理的な免疫療法であると考えられた。

## 5 結 語

担癌患者末梢単核球の PHA 刺激による IL2 産生能と非特異的キラー活性について検討し, 以下の結果を得た。

1) 健常者及び進行癌患者末梢単核球の PHA 刺激 IL2 産生能は, 各々  $524.1 \pm 250.4$  nJ. U./cell,  $139.3 \pm 85.4$  nJ. U./cell で後者に有意の低下がみられた。また, IL2 の低下は原発部位に関係なく共通して認められた。

2) 癌患者末梢単核球の LPS 刺激による IL1 活性は, 健常者よりむしろ高値で, IL2 産生の低下に関与していないものと考えられた。

3) 癌患者末梢単核球より, 付着細胞を除去すると IL2 活性は上昇することより, 抑制性単球の寄与が示唆され, 健常者と癌患者末梢リンパ球を交互に再構成して IL2 活性をみると癌患者単球により強い抑制作用がみられた。

4) この癌患者単球の IL2 抑制作用は、健常者単球と異なり、indomethacin で抑制の解除がおこらず、PMA により解除され、異なった機構が存在するものと考えられた。

5) 進行癌患者の PHA により誘導される非特異的キラー (PAK) 活性は、*in vitro* で有意な活性の低下を示したが、PAK 誘導過程に rIL2 を補充添加すると有意な活性の増強を認めた。

6) rIL2 の添加で誘導した IL2 activated killer は K562 及び Daudi 細胞を標的とした時、健常群では各々  $738.25 \pm 271.73$  L. U.,  $579.36 \pm 230.71$  L. U. 癌患者では各々  $628.74 \pm 291.81$  L. U.,  $483.64 \pm 199.63$  L. U. と高い障害活性を示し、両者間で有意差を認めず、癌患者でも健常者と同程度のキラー前駆細胞が存在すると考えられた。

以上、IL2 産生能の低下した進行癌患者に対する rIL2 の補充は、細胞性免疫能低下の是正と抗癌エフェクター細胞の活性化に有用であると考えられた。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲下さった本学内科学第四講座、漆崎一朗教授に感謝いたします。また直接ご指導、ご協力いただいた高後裕講師、並びに教員諸兄に心から感謝いたします。

本研究の一部は厚生省がん研究助成金（がん化学療法の効果増強に関する研究班）の補助による。

## 文 献

- Lafferty, K. J., Andrus, L. and Prowse, S. J.: Role of lymphokine and antigen in the control of specific T cell responses. *Immunol. Rev.* **51**, 279-314 (1980).
- Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, E. D. and Henney, S. C.: Murine NK cell cultures: Effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.* **126**, 2321-2327 (1981).
- 小玉正智, 寺田信國, 田中承男, 橋本 勇: 胃癌患者における各種免疫学的パラメーターの検討—とくに胃癌進行度と非特異的免疫能について— *臨床免疫* **10**, 461-468 (1978).
- Zembala, M., Mytar, B., Popiela, T. and Asherson, L. G.: Depressed *in vitro* peripheral blood lymphocyte response to mitogens in cancer patients: The role of suppressor cells. *Int. J. Cancer* **19**, 605-613 (1977).
- 長井忠則: 担癌生体の細胞性免疫に関する研究. 第2報 胃癌患者リンパ球の PHA 反応と血清中の反応抑制因子の本態. *札幌医誌* **46**, 474-490 (1977).
- 漆崎一朗, 長井忠則, 石谷邦彦, 近藤 敦, 吉田憲基, 後町洋一: 肺癌患者の細胞性免疫能にかんする研究—血清の非特異的免疫抑制作用について—肺結核との対比. *肺癌* **17**, 199-211 (1977).
- Wanebo, J. H., Rao, B., Miyazawa, N., Martini, N., Middleman, P. M., Oettgen, F. H. and Beattie, J. H.: Immune reactivity in primary carcinoma of the lung and its relation to prognosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **72**, 339-348 (1976).
- 近藤 敦: 肝癌患者血清中の非特異的免疫抑制因子の分析にかんする研究. *札幌医誌* **51**, 357-376 (1982).
- Mekori, T., Sher, S. and Robinson, E.: Suppression of the mitogenic response to phytohemagglutinin in malignant neoplasia: Correlation with clinical stage and therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 9-12 (1974).
- Takasugi, M., Ramseyer, A. and Takasugi, J.: Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.* **37**, 413-418 (1977).
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fugita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R. and Hamuro, J.: Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* **302**, 305-310 (1983).
- Varela, A. J. and Segovia, A. D.: Decreased production of response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **69**, 1388-1392 (1982).
- Israeli, L. M., Bakke, C. A., Kitridou, C. R., Gendler, S., Gillis, S. and Horwitz, A. D.: Defective production interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Immunol.* **130**, 2651-2655 (1983).
- Miyasaka, N., Murata, N., Yamaoka, K., Sato, K., Yamada, T., Nishido, T. and Okuda, M.: Interleukin 2 defect in peripheral blood and the lung in patients with Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **65**, 497-505 (1982).
- Flomenberg, N., Welte, K., Mertelsmann, R., Kernan, N., Ciobanu, N., Venuta, S. and O'Reilly, R.: Immunologic effects of interleukin 2 in primary immunodeficiency disease. *J. Immunol.* **130**, 2644-2649 (1983).
- Murray, W. H., Welte, K., Jacobs, L. J. Rubin, Y. B., Mertelsmann, R. and Roberts, B. R.: Production of and *in vitro* response to interleukin 2 in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Invest.* **76**, 1959-1964 (1985).

17. Minta, O. J. and Pambrun, L.: *In vitro* induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am. J. Clin. Pathol.* **199**, 111-126 (1985).
18. Gillis, S. and Watson, J.: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* **152**, 1709-1719 (1980).
19. Gery, I., Gershon, K. R. and Waksman, H. B.: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J. Exp. Med.* **136**, 128-142 (1972).
20. Palacios, R., Ivhed, I., Sideras, P., Nilsson, K., Sugawara, I. and Fernandez, C.: Accessory function of human tumor cell lines. I. Production of interleukin 1 by the human histiocytic lymphoma cell line U-937. *Eur. J. Immunol.* **12**, 895-899 (1982).
21. Kadish, S. A., Doyle, T. A., Steinhauer, H. E. and Ghossein, A. N.: Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Efficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J. Immunol.* **127**, 1817-1822 (1981).
22. Baker, P. E., Gillis, S., Ferm, M. M. and Smith, A. K.: The effect of T cell growth factor on the generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.* **121**, 2168-2173 (1978).
23. Larsson, E. L., Iscove, N. N. and Coutinho, A.: Two distinct factors are required for induction of T-cell growth. *Nature* **283**, 664-666 (1980).
24. Smith, A. K., Lachman, B. L., Oppenheim, J. J. and Favata, F. M.: The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* **151**, 1551-1556 (1980).
25. Gillis, S. and Smith, A. K.: T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**, 2027-2032 (1978).
26. Watson, J., Gillis, S., Marbrook, J., Mochizuki, D. and Smith, A. K.: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines. *J. Exp. Med.* **150**, 849-861 (1979).
27. Gillis, S., Smith, A. K. and Watson, J.: Biochemical characterization of lymphocyte regulatory molecules. II. Purification of a class of rat and human lymphokines. *J. Immunol.* **124**, 1954-1962 (1979).
28. Kern, D. E., Gillis, S., Okada, M. and Henney, S. C.: The role of interleukin 2 (IL 2) in the differentiation of cytotoxic T cells: the effect of mononuclear anti-IL 2 antibody and absorption with IL 2 dependent T cell lines. *J. Immunol.* **127**, 1323-1328 (1981).
29. Gillis, S., Gillis, E. A. and Henney, S. C.: Monoclonal antibody directed against interleukin-2. I. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis and the *in vitro* differentiation of alloreactive cytolytic T cells. *J. Exp. Med.* **154**, 983-988 (1981).
30. Farrar, J. J., Mizel, B. S., Fuller-Bonar, J., Farrar, L. W. and Hilfiker, L. M.: Macrophage-independent activation of helper T cells. I. Production of Interleukin 2. *J. Immunol.* **125**, 793-798 (1980).
31. Pollack, S., Micali, A., Kinne, W. D., Enker, E. W., Geller, N., Oettgen, F. H. and Hoffmann, K. M.: Endotoxin-induced *in vitro* release of interleukin 1 by cancer patients' monocytes: Relation to stage of disease. *Int. J. Cancer* **32**, 733-736 (1983).
32. Rey, A., Klein, B., Zagury, D., Thierry, C. and Serrou, B.: Diminished interleukin-2 activity production in cancer patients bearing solid tumors and its relationship with natural killer cells. *Immunol. Lett.* **6**, 175-178 (1983).
33. Bonnard, G. D., Yasaka, K. and Maca, D. R.: Continued growth of functional human T lymphocytes: Production of human T-cell growth factor. *Cell. Immunol.* **51**, 390-401 (1980).
34. Bonnard, G. D.: Long-term cultures of immunocompetent T lymphocytes. The lymphocyte, Soll, K. W. and Miller, W. V. ed Alan R. Liss, Inc., New York. 45-56 (1981).
35. Chouaib, S. and Fradelizi, D.: The mechanism of inhibition of human IL 2 production. *J. Immunol.* **129**, 2463-2468 (1982).
36. Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F. and DEWeck, L. A.: Lymphokine regulation of activated (G<sub>1</sub>) lymphocytes. I. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.* **130**, 1770-1773 (1983).
37. Hirano, T., Fujimoto, K., Teranishi, T., Nishino, N., Onoue, K., Maeda, S. and Shimada, K.: Phorbol ester increase the level of interleukin 2 mRNA in mitogen-stimulated human lymphocytes. *J. Immunol.* **132**, 2165-2167 (1984).
38. Weinberg, B. J. and Misukonis, A. M.: Phorbol diester-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by peritoneal macrophages: Different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produc-

- tion by macrophages from normal and BCG-infected mice despite comparable phorbol diester receptors. *Cell. Immunol.* **80**, 405-415 (1983).
39. Gerns, D., Staar, U., Grimm, W., Hausmann, G., Korner, F. C., Resch, K. and Krammer, H. P.: Stimulation of macrophage activity by 12-o-tetra decanoyl phorbol-13-acetate. *IARC. Sci. Publ.* **56**, 319-336 (1984).
40. Gillis, S. and Smith, A. K.: Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* **268**, 154-156 (1977).
41. Wagner, H., Hardt, C., Heeg, K., Pfizenmaier, K., Solbach, W., Bartlett, R., Stockinger, H. and Rölinghoff, M.: T-Tcell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T-cell derived helper factor (interleukin 2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic maturation of CTL progenitors. *Immunol. Rev.* **51**, 215-255 (1980).
42. Wagner, H., Hardt, C., Heeg, K., Rölinghoff, M. and pfizenmaier, K.: T-cell derived helper factors allows *in vivo* induction of cytotoxic T-cells in nu/nu mice. *Nature* **284**, 278-280 (1980).
43. Henney, S. C., Kuribayashi, K., Kern, E. D. and Gillis, S.: Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* **291**, 335-338 (1981).
44. Hefeneider, S. H., Henney, S. C. and Gillis, S.: *In vivo* interleukin-2 induced augmentation of natural killer cell activity. In NK cells and other natural effector cells. R. B. Herberman, ed. Academic press, New York. 421-426 (1982).
45. Grimm, A. E., Mazumder, A., Zhang, Z. H. and Rosenberg, A. S.: Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 1823-1841 (1982).
46. Mazumder, A., Grimm, A. E. and Rosenberg, A. S.: Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated *in vitro* with phytohemagglutinin. *J. Immunol.* **130**, 958-964 (1983).
47. Vanky, F., Gorsky, T., Gorsky, Y., Masucci, M. G. and Klein, E.: Lysis of tumor biopsy cells by autologous T lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor. *J. Exp. Med.* **155**, 83-95 (1982).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 笹川 裕